

2.3 转录效率

按最佳反应条件进行转录反应, 每 1 pmol DNA 模板可生成 40 pmol 的 tRNA^{Ile}, 回收到的 tRNA 是 DNA 模板量的 40 倍. 以上结果说明我们建立了较为理想的体外转录反应条件, 从而可以进一步扩大反应体积, 制备出足量的不含修饰碱基的 tRNA^{Ile} 制品, 应用于结构与功能的研究.

参 考 文 献

- 1 Peng ZH, Kusama Eguchi K, Watanabe S *et al.* Responsibility of tRNA^{Ile} for spermine stimulation of rat liver Ile tRNA formation. *Arch Biochem Biophys*, 1990, **279**: 138~ 145
- 2 Ogilvie K K *et al.* Total chemical synthesis of a 77-nucleotide-long RNA sequence having methionine-acceptance activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 5764~ 5768
- 3 Sampon J R, Uhlenbeck O C. Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 1033~ 1037
- 4 Milligan J F, Grobe D R, Witherell G W *et al.* Oligonucleotide synthesis using T7-RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucl Ac Res*, 1987, **15**: 8783~ 8798
- 5 刘建华, 王德宝. 用 T7-RNA 聚合酶体外转录合成 RNA 片段. *生物化学与生物物理学报*, 1991, **23** (6): 500 ~ 505

Transcription of Rat Liver tRNA^{Ile} Gene with T7 RNA Polymerase. ZHANG Lu, ZHONG Xionglin, PENG Zhaohui, XU Qian (*The Molecular Biology institute of the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

Abstract The rat liver tRNA^{Ile} gene has been synthesized before. Now the synthetic tRNA^{Ile} gene was transcribed *in vitro* with T7 RNA polymerase and the optimum reaction condition was investigated.

Key words T7 RNA polymerase, rat liver tRNA^{Ile} gene, *in vitro* transcription

鸡蛋胚下表层卵黄 DNA 的提取方法

孙立军 许怀庆 陈楚楚

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 利用 Ficoll-400 不连续密度梯度离心将受精和未受精鸡蛋的胚下表层卵黄进行纯化, 显微镜观察表明卵黄球形态良好, 没有胚细胞的存在. 然后利用较高浓度的蛋白酶 K 消化, 较长时间的酚抽提, 最后提取了 DNA. 电泳显示 DNA 条带清晰. 该方法简便快速, 从每个鸡蛋的胚下表层卵黄可回收 10 ng DNA.

关键词 DNA 提取, 卵黄球, 密度梯度离心

许多动物的卵母细胞和成熟卵中 DNA 含量大大超出体细胞 DNA 的含量^[1,2], 关于这些 DNA 的归属问题曾有人认为它们主要是线粒体 DNA^[3], 但随着研究的深入, 更多的学者认为这些 DNA 是卵黄内在的 DNA^[4~6]. 后来, Bruce 等^[7,8] 从早期鸡胚的细胞内卵黄颗粒中发现并提取了 DNA. 本研究室^[9,10] 发现

鸡蛋胚下表层卵黄中也存在 DNA, 并利用免疫组化和原位杂交技术进一步证实了这种 DNA 的存在. 为了进一步研究卵黄中 DNA 的性质和功能, 必须建立一种简便快速的提取方法. 以前的提取方法^[9,10] 操作复杂, 回收率

收稿日期: 1996-03-20, 修回日期: 1996-08-19

不够高. 本文建立的方法操作简便, 可以达到较高的回收量并能排除其他 DNA 污染.

1 材料和方法

1.1 材料

Leghorn White 鸡蛋 (北京农业大学养鸡场), 受精和未受精, 都是未孵育的.

1.2 卵黄球的纯化

将鸡蛋的卵黄与卵清分开, 调整卵黄位置使之胚盘向上. 用眼科剪剪下胚盘, 吸取胚下卵黄 0.2 ml, 悬浮于等体积 PBS (1.37 mmol/L Na_2HPO_4 , 8 mmol/L KH_2PO_4 , 137 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, pH 7.4) 中, 用吸管连续吹打, 直至均匀. 将悬浮液铺于 Ficoll-400 密度梯度上. 该梯度共 4 层, 由上到下依次是 5%, 12%, 15% 和 20% 的 Ficoll-400, 都用 PBS 配制. 离心 12 000 g, 30 min, 离心后取 5% ~ 12% 和 12% ~ 15% 两个界面, 镜检后用 PBS 洗至少 3 次.

1.3 DNA 的提取

将沉淀悬浮于缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 50 mmol/L EDTA- Na_2 , 5 mmol/L CaCl_2) 中, 加蛋白水解酶 K (Merck 公司) 至 0.5 g/L, N-月桂酰肌氨酸 (Sigma 产品) 至 1%, 在 55 °C 温育 5 h. 随后饱和苯酚抽提 2 次, 氯仿抽提 1 次, 加等体积异丙醇, 在 -30 °C 放置过夜, 离心, 12 000 g, 10 min, 70% 乙醇洗 1 次, 真空抽干, 溶解于 TE 中, 加 RNase A 至 0.1 g/L, 37 °C 温育 30 min, 苯酚抽提, 异丙醇沉淀, 12 000 g 离心 10 min, 70% 乙醇洗后抽干.

1.4 电泳检测

将所提 DNA 在 0.8% 琼脂糖胶板上进行电泳, 电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$, 电压 2.5 V/cm. 电泳后用溴化乙锭染色, 紫外灯下观察照相.

1.5 回收量的测定

利用微型凝胶法测定 DNA 的回收量, 具体方法参照文献 [11].

2 结果

2.1 卵黄球的纯化

密度梯度离心后, 取 5% ~ 12%, 12% ~ 15%, 15% ~ 20% 三个界面分别镜检, 发现前两个界面含有非常纯净的卵黄球, 其形态良好, 没有胚细胞污染 (图 1).

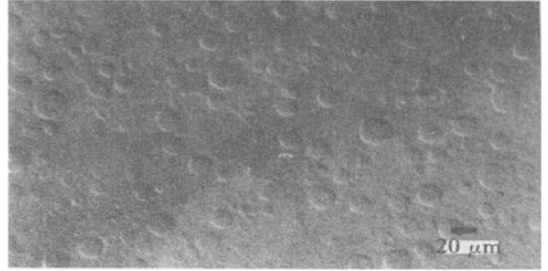


图 1 显微镜观察纯化的卵黄球

2.2 DNA 抽提和电泳检测

经蛋白酶 K 消化后, 混浊的悬浮液变得清澈透明. 电泳显示所提 DNA 条带清晰 (图 2).

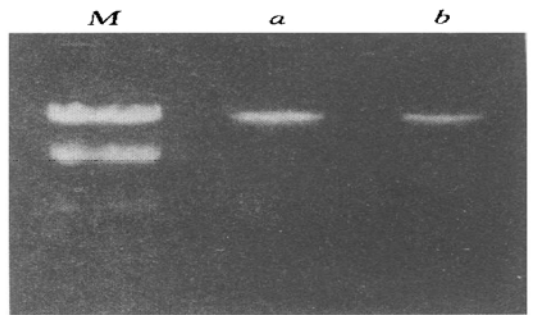


图 2 受精鸡蛋和未受精鸡蛋卵黄球 DNA 的电泳图谱

电泳支持物为 0.8% 琼脂糖, TBE 缓冲液. M: 分子质量标准: λ DNA/Hind III/EcoRI; a: 受精鸡蛋; b: 未受精鸡蛋.

2.3 回收量的测定

用此法可从每个鸡蛋的 0.2 ml 胚下表层卵黄回收 10 ng DNA.

3 讨 论

受精鸡蛋和未受精鸡蛋的胚下表层卵黄经密度梯度离心后, 在 5%~12%, 12%~15%, 15%~20% 三个界面上都有沉淀物聚集. 镜检后发现, 5%~12%, 12%~15% 两个界面中含有大量的卵黄球, 形态比较均匀, 没有胚细胞的污染 (图 1). 而 15%~20% 界面上也有少量卵黄球, 但形态不好, 并有杂质污染. 由此推算, 卵黄球在 Ficoll-400 中的浮力密度大约是 $1.02\sim 1.04\text{ g/cm}^3$. 根据文献报道^[12,13], 在 Ficoll-400 中, 细胞核和线粒体的浮力密度均大于 1.10 g/cm^3 , 可以穿过 20% Ficoll 而沉降于离心管最底部. 完整的胚细胞也可穿过 15% Ficoll. 所以, 利用 Ficoll-400 密度梯度离心可以完全排除线粒体, 细胞核, 胚细胞的污染. 另外的一种可能的污染是来自于游离的胚 DNA 或染色质, 它们粘附于卵黄球膜上, 但我们利用免疫组化和原位杂交技术已排除了这种可能性 (另文发表). 以上四点可保证提取的 DNA 是卵黄球内在的 DNA.

由图 2 看, 受精和未受精鸡蛋胚下表层卵黄球中均有 DNA 存在. 我们知道, 未受精鸡蛋只有一个雌原核, 其 DNA 含量只有 1.5 pg , 即使不排除它的污染, 对提取的干扰也是可以忽略的. 故由未受精鸡蛋卵黄球提取的 DNA 不存在其他 DNA 污染的问题.

鸡蛋卵黄球中含有大量蛋白, 因此在裂解之后需要较高浓度的蛋白水解酶 K 消化, 消化时间也应延长. 根据我们的经验, 如果降低蛋白水解酶 K 的浓度或缩短消化时间, DNA 回收量会显著降低. 在抽提过程中, 也必须延长与酚混合的时间, 才能保证比较稳定的回收量. 由此推测, 卵黄球中的 DNA 可能与特定蛋白有某种较为紧密的结合. 成功地提取卵黄球 DNA, 为进一步研究其性质和功能创造了条件.

参 考 文 献

1 Brachet J, Ficq A. Binding sites of ^{14}C -actinomycin in

amphibian oocytes and an autoradiography technique for the detection of cytoplasmic DNA. *Exp Cell Res*, 1965, **38**: 153~159

2 Baltus E, Brachet J. Le Dosage de L'acide. Desoxyribonucleique dans les oeufs de batraciens. *Biochim Biophys Acta*, 1962, **61**: 157~163

3 Dawid I B. Evidence for the mitochondrial origin of frog egg cytoplasmic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, **56**: 269~276

4 Baltus E, Hanocq-Quertier J, Brachet J. Isolation of deoxyribonucleic acid from the yolk platelets of *Xenopus laevis* oocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, **61**: 469~476

5 Anderson W A. Nuclear and cytoplasmic DNA synthesis during early embryogenesis of *paracentrotus lividus*. *J Ultrastruct*, 1969, **26**: 95~110

6 Hanocq F, Kirschr Volders M, Hanocq-Quertier J *et al.* Characterization of yolk DNA from *Xenopus laevis* oocytes ovulated *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69**: 1322~1326

7 Bruce L, Emanuelsson H. Isolation of intracellular yolk granules in early chick embryos and estimation of their DNA content. *Experientia*, 1971, **27**: 817~819

8 Bruce L, Emanuelsson H. Analysis of DNA isolated from intracellular yolk granules in the early chick blastoderm. *Exp Cell Res*, 1975, **92**: 462~466

9 李玉安, 李 莱, 潘宗耀等. 鸡胚细胞核和胚下卵黄颗粒染色质的电子显微镜观察. *中国科学 B 辑*, 1982, **11**: 1007~1010

10 李玉安, 李 莱, 潘宗耀等. 鸡胚细胞核和胚下卵黄颗粒 DNA 分子的电子显微镜观察. *中国科学 B 辑*, 1982, **12**: 1089~1091

11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: Index E6

12 Price C A. *Centrifugation in density gradient*, New York: Academic Press, 1982: 274

13 Rickwood D. *Centrifugation, the practical approach series*, 2nd. England: IRL Press Limited, 1984: 32

Isolation of Yolk DNA from Fertilized and Unfertilized Chichen Eggs. SUN Lijun, XU Huaqing, CHEN Chuchu (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract Ficoll-400 discontinuous density gradient centrifugation was used to purify superficial

yolk spheres under blastoderms of fertilized chicken eggs and the corresponding site of unfertilized eggs. Under microscope, the purified yolk spheres showed good morphology and no contamination from embryonic cells was observed. The purified yolk spheres were lysed and digested with high concentration of proteinase K then

extracted for long time with phenol. When subjected to agarose gel electrophoresis, the DNA showed a clear band. The recovery of DNA is approximately 10 ng per fertilized or unfertilized egg.

Key words DNA isolation, yolk sphere, density gradient centrifugation

APS 1997 全国生化药理与生物工程新药 研制与开发学术研讨会通知

中国药理学会中国药理学报 (APS) 编辑委员会将于 1997 年 11 月 5~8 日在广东省珠海市召开“全国生化药理与生物工程新药研制与开发学术研讨会”。会议将由珠海恒通生物工程制药公司协办。会议将邀请中国药理学报著名专家编委作有关专题报告。会议主题为总结和交流: ①生物化学、生物物理学、生化药理学研究进展及在新药研制与开发中的应用; ②生物工程的研究进展, 基因工程、细胞工程、蛋白质工程、酶工程、发酵工程等生物技术在新药研究与开发中的应用; ③参观考察恒通生物工程制药公司并组织座谈。会议征文要求: 来稿必须是未公开发表过的学术性论文。综述性文章请提前联系。请寄 800 字以内 (中

文或英文) 论文结构式摘要, 包括 AIM (目的), METHODS (方法), RESULTS (结果), CONCLUSION (结论) 四部分。请加盖公章或附单位介绍信, 注明工作单位、地址、邮编、联系电话。务必在信封或传真上注明“药理学报会议征文”。征文截止日期为 1997 年 9 月 5 日。无论文者也可索取报名表, 报名截止日期为 1997 年 9 月 20 日。本次会议注册费 500 元/人, 车旅费及食宿费自理。具体安排见报到通知。在收到您的报名之后将适时寄去报到通知。征文或报名请寄: 200031 上海市太原路 294 号《中国药理学报》编辑部 朱倩蓉收, 联系电话: (021) 64311833 转 200, 传真: (021) 64370269。